67—71 3672(13)

动 物 学 研 究 1994, 15 (4): 67—71 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

曼氏血吸虫发育过程中的基因组 DNA 变异

樊晋江
(浙江省医学科学院寄生虫病研究所* 杭州 310013)
Paul J. Brindley Brindley, PJ
(昆士兰医学研究所热带卫生规划处, 澳大利亚昆士兰 4029)

R383.24

A **摘要** 曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*)和日本血吸虫(*S. japonicum*)成虫和曼氏血吸虫尾蚴基因组 DNA 经限制性内切酶 *Bam* HⅠ消化后，分别与^{32}p-dCTP 标记的来源于核糖体 DNA 的 pSM HCR5、pSM HCR4 PSM 889 探针杂交。曼氏血吸虫尾蚴和成虫在 pSM HCR4 杂交带型的 1.6—2.8 kb 之间，存在有明显不同的次杂交带；而 pSM HCR5 和 pSM 889 的杂交带型，无明显差异。此外，pSM HCR5 杂交带型中，日本血吸虫成虫无 3.0 kb 带，可明显区别于曼氏血吸虫。结果表明，在曼氏血吸虫尾蚴至成虫的发育过程中，基因组 DNA 发生缺失或重组。这一发现进一步证实了曼氏血吸虫毛蚴与成虫间存在发育期特异性 DNA 的假设。曼氏血吸虫发育过程中，基因组 DNA 的动态变化可能与其适应环境有关。

关键词 曼氏血吸虫，个体发育，基因缺失，DNA 杂交，限制性内切酶 基因组，DNA

血吸虫在螺蛳和哺乳动物寄主中发育，经历着巨大的形态、生理和生化上的变化。血吸虫在螺蛳体内行无性繁殖，而在哺乳动物体内交配、产卵行有性生殖。毛蚴和尾蚴均需与外界环境短期接触后，寻求寄主才能进一步发育。

虽然已有关于血吸虫发育过程中基因组 DNA 变异的报道(Nara 等，1990)，但是有些学者(McCutchan 等，1984)则认为血吸虫不同生活史阶段的基因组 DNA 多态非常相似。在某些真核生物中，已发现发育过程中的基因重组现象与抗性差异(Seidman 等，1978)、细胞表面抗原变异(Van der Ploge 等，1989)、卵壳蛋白基因的表达(Sprindling 等，1980)有关。

本文为进一步证实血吸虫发育过程中基因组 DNA 变异，我们对曼氏血吸虫(*S. mansoni*; OZ. A 株)尾蚴和成虫，另一株曼氏血吸虫(*S. manson*; NMRI 株)成虫以及日本血吸虫(*S. japonicum*; 安徽株)成虫用 3 种不同核糖体 RNA 基因探针进行了分子杂交实验。

1 材料和方法

血吸虫成虫和尾蚴：曼氏血吸虫(*S. mansoni*; OZ. A 和 NMRI 株)成虫，尾蚴

---

* 世界卫生组织蠕虫病研究合作中心

本文 1993 年 10 月 4 日收到，1994 年 3 月 21 日修回

(OZ. A株)、以及日本血吸(*S. japonicum*: 安徽株)成虫，均由澳大利亚昆士兰医学研究所分子生物学实验室提供。

基因组DNA制备：约100条成虫或大批量尾蚴用生理盐水洗净后置于小量提取液中(50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH8.0)，将虫体研磨匀浆，加1.8 ml提取液，0.2 ml 10% SDS，100 ml蛋白酶K(20 mg／ml)，充分摇匀在37℃间歇温床培养2 h。用等体积酚、酚／氯仿、氯仿抽提3次，最后用100%乙醇沉淀，并用70%乙醇洗涤1次，真空干燥，重溶于TE缓冲液(pH7.4)，储存-70℃备用。

酶：限制内切酶 *Bam* H1、*Hind* Ⅲ和 *Pst* Ⅰ均用于消化血吸虫成虫和尾蚴的基因组DNA或切割载体质粒。操作均按(Boehringer Mannhein Biochemicals)公司所提供的产品说明进行。

基因探针制备及其放射性标记：DNA探针有3个。pSM HCR4 (0.8 kb)和pSM 889 (4.4 kb)系曼氏血吸虫核糖体rRNA基因的 *Pst* Ⅰ片段和 *Bam* HⅠ片段(由Dr. Brindley实验室提供)。pSM HCR5(0.8 kb)是我们采用 pSM HCR0 (=pSM 389) (3.1 kb)的 *Bam* HⅠ／*Hind* Ⅲ非转录间隔区(NTS)片段，用过量T4连接酶与载体PUC 19结合，克隆入大肠杆菌(*Escherichia coli*: $DH_{5\alpha}$)，在重组DNA提取和纯化后获得。各探针来源见图1所示。DNA探针以^{32}p-dCTP按缺口平移法标记。标记活性为1×10^8 cpm／μg。

Southern印渍：血吸虫基因组DNA采用限制性内切酶(*Bam* HⅠ)在37℃消化2—4 h。DNA消化产物以0.8%琼脂糖凝胶(agarose gel)平板电泳16 h分离(40V)。然后，据Southern(1975)方法，转印于硝酸纤维膜上。

膜杂交：用^{32}p标记的pSM HCR5、pSM HCR4、pSM 889与硝酸纤维膜在30 ml杂交液中(1 mM EDTA, 0.2 M Na_2HPO_4, 7%SDS)，65℃温床杂交24 h。然后，顺序洗涤杂交膜3次，保持湿润备用。使用KodaKX-Omat胶片在-70℃下放射自显影4 d至2周。标记的探针在50%和1%SDS洗涤液中，67℃洗涤1 h，被洗脱。另外2种探针分别按上述方法进行多次杂交。最后，采用计算机软件ImageQuant 3.2扫描胶片，绘制和标记杂交图谱，供分析和研究使用。

2 结果

Southern印渍图谱如图2所示。由图2可见，经 *Bam* HⅠ消化后的血吸虫成虫、尾蚴基因组DNA，分别与pSM HCR5、pSM HCR4、pSM 889杂交后，在pSM HCR4

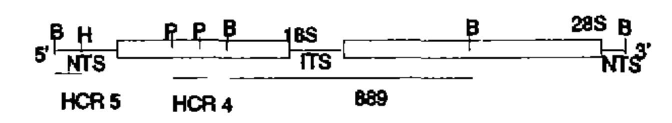


图1 曼氏血吸虫核糖体RNA基因单位结构

Fig. 1 The arrangement of the ribosomal RNA gene unit of *S. mansoni*

B、H和P为限制性内切酶 *Bam* HⅠ，*Hind* Ⅲ和 *Pst* Ⅰ的酶切位点 NTS和ITS分别为非转录间隔区和内转录间隔区。pSM HCR5，pSM HCR4和pSM 889，3种DNA探针来源如图下方所示。(参 McCutchan, 1984)

杂交带型(B)中，曼氏血吸虫尾蚴在 1.6—2.8 kb 之间，有多条明显的杂交带。而成虫缺如，但其共有 3.0 kb 主杂交带。曼氏血吸虫成虫二株(OZ. A 和 NMRI)在 pSM HCR4 的杂交带型(B)中，NMRI 约在 2.7 kb 处有一弱杂交带，其它两探针杂交带型无明显差异。虫种间杂交带型亦有明显区别，日本血吸虫成虫在 pSM HCR5 杂交带型(A)中，明

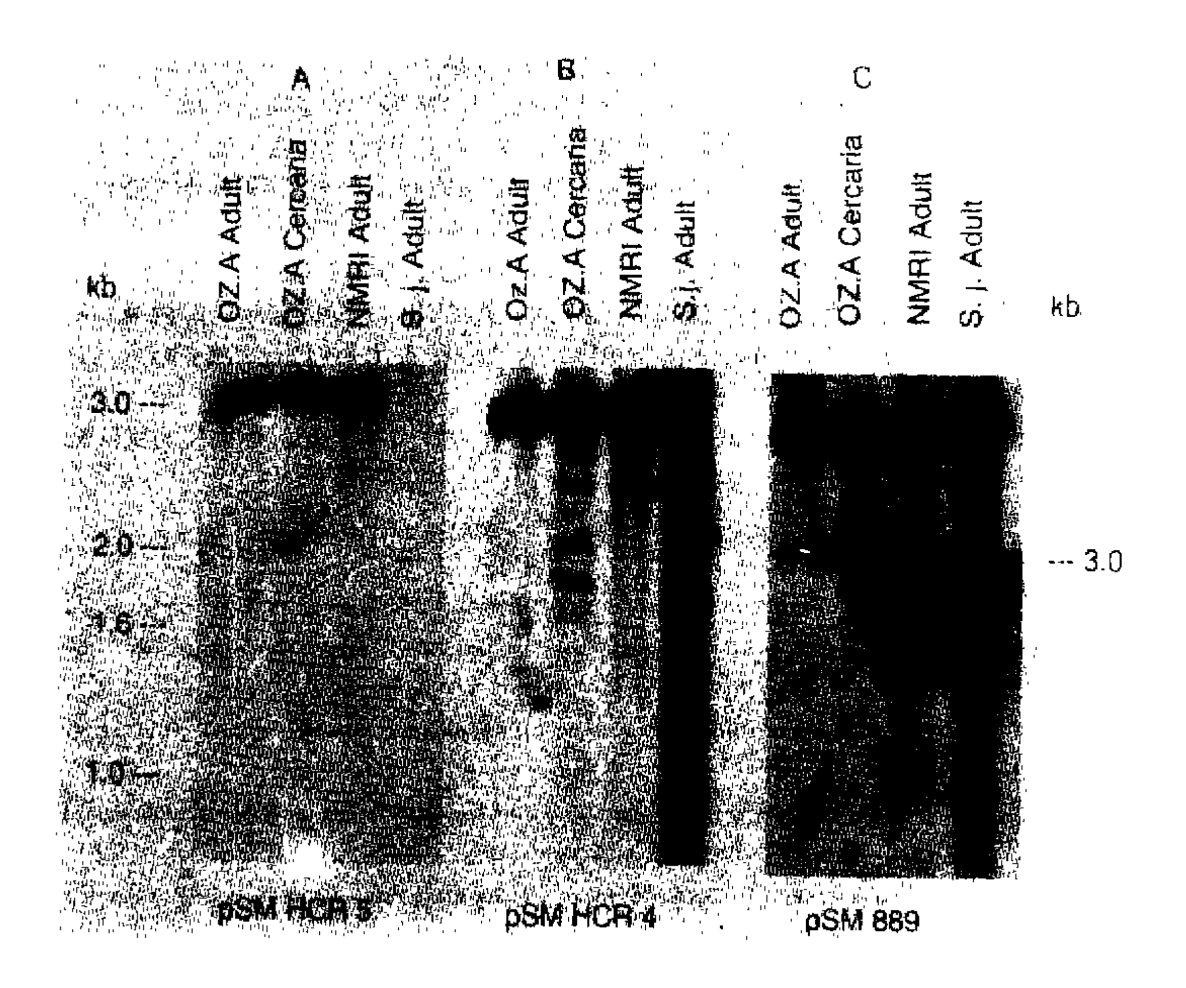


图 2 曼氏血吸虫(OZ. A 株)成虫和尾蚴，曼氏血吸虫(NMRI 株)成虫，日本血吸虫(安徽株)成虫在 *Bam* H I 消化后与 ^{32}P 标记的 rRNA 基因探针–pSM HCR5，pSM HCR4 和 pSM 889 的杂交带型(A. B. C)

Fig. 2 Hybridization of ^{32}p-labelled probes pSM HCR5, pSM HCR4 and pSM 889, which form part of the schistosome ribosomal RNA genes, to Southern blots of genomic DNA isolated from *S. mansoni* (OZ. A) adult and cercaria, *S. mansoni* (NMRI) adult, and *S. japonicum* adult as shown in panel A, B and C

图谱 A、B 的 kb 标记于图左侧，图谱 C 的 kb 标注于图右侧

显缺失 3.0 kb 杂交带，而在 pSM HCR4 和 pSM 889 杂交带型(B 和 C)中，呈现有强的杂交信号，但仍可看出 3 种杂交带型(A、B 和 C)与曼氏血吸虫成虫和尾蚴形成鲜明对比。

3 讨论

本项研究表明用 rRNA 基因中的 18 s 编码区 *Pst* Ⅰ消化片段(pSM HCR4)作为基因探针与曼氏血吸虫(OZ. A 株)成虫和尾蚴基因组 DNA 杂交，呈现发育阶段特异性杂交带型。这种期特异性 DNA 的丢失或重组可能与病毒感染、转移因子和抗原差异有关(Leski 等，1986；Sakano 等，1978)。Nara(1990)认为血吸虫发育过程中至少有两次基因重组，即在毛蚴的形成和子孢子的分裂过程中，表现有期特异性 DNA 序列。尾蚴与成虫基因组 DNA 差异表明了血吸虫发育至少有 3 次以上的 DNA 重组现象，这可能与血吸虫适应差异巨大的生活环境密切相关。为探讨基因组 DNA 在血吸虫发育过程的动态变化及其意义，有必要进一步对其进行深入系统的研究。

血吸虫基因组 DNA 中的核糖体 RNA 基因编码区(pSM HCR4)同源序列的动态变化，表明 18 s 基因是一个易变的"热点"。业已证明 18 s 基因的变异与曼氏血吸虫噻吨酮(hycanthone)的抗性有关(Brindley 等，1991)。但是这种变化如何影响到基因表达还不十分清楚。

此外，核糖体 RNA 基因探针对株间和种间差异的鉴别和区分，有重要的实际意义。

参 考 文 献

Brindley P J *et al*, 1991 Characterization of a programmed alteration in an 18s ribosomal genes that accompanies the experimental induction of drug resistance in *Schistosoma mansoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **88**: 7754-7758.

Lasko *et al*, 1986. Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell*. **44**: 7-19.

McCutchan F T *et al*, 1984. Differentiation of schistosomes by species, strains, and sex by using cloned DNA markers. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, **81**: 889-893.

Nara T *et al*, 1990. Dynamic changes of DNA sequences in *Schistosoma mansoni* in the course of development. *Parasitology*, **100**: 241-245.

Sakano *et al*, 1979. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobin light-chain genes. *Nature*, **280**: 288-294.

Seidman J C *et al*, 1978. The arrangement and rearrangement of antibody genes. *Nature*, **276**: 790-795.

Spradling A C *et al*, 1980. Amplification of genes for chorion proteins during oogenesis in *Drosophila melanogster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 1096-1100.

Van Der Ploge, L H T *et al*, 1989. Chromosomes rearrangements in *Trypanosoma brucei*. *Cell*, **39**: 213-221.

GENOMIC VARIABILITY BETWEEN ADULT AND CERCARIA OF *Schistosoma mansoni*

Fan Jinjiang

(*Institute of Parasitic Diseases**, *Zhejiang Academy of Medical Sciences*, *Hangzhou* 310013)

Paul J. Brindley

(*Tropical Health Program*, *Queensland Institute of Medical Research*, *Qld* 4029 *Australia*)

Abstract

Genomic DNA was prepared from *Schistosoma mansoni* (OZ. A) adult and cercaria, *S. mansoni* adult (NMRI), *S. japonicum* adult, and was hybridized to three ^{32}p-labelled probes pSM HCR5, pSM HCR4, pSM 889 after cleavage by restriction endonuclease *Bam* H I. The resulting hybridization banding patterns with pSM HCR4 are significantly different between cercaria and adult of *S. mansoni* (OZ. A) from 1.6 kb to 2.8 kb except there is a same size 3.0 kb major band. There is a minor band in pSM HCR4 pattern for *S. mansoni*, which can be identified from *S. mansoni* adult (OZ. A). Moreover, *S. japonicum* adult have no 3.0 kb major band in pSM HCR5 pattern, which can be distinguished from *S. mansoni*. The results showed that there was a drastic change of genomic DNA from cercaria to adult, which maybe related to the adaptation of *S. mansoni* to extremely different living environment in their life-cycle, and also provides more immediate evidence of existence of dynamic changes in the course of development in *S. mansoni*.

Key words *Schistosoma mansoni*, Individual development, Gene elimination, DNA hybridization, Restriction endonuclease

---

* WHO Collaborating Centre for Research on Helminthiasis